

生黄合剂对缺血再灌注损伤大鼠心肌细胞凋亡相关基因 Bax, Bcl-2 和 Caspase-3 蛋白表达的影响

高玉峰¹, 王小杰¹, 闫文翠², 张维娜², 李欣¹, 张凤英¹

(1. 承德医学院, 河北 承德 067000; 2. 承德护理职业学院, 河北 承德 067000)

[摘要] 目的: 观察生黄合剂对缺血再灌注损伤大鼠心肌细胞凋亡相关基因 Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax)、B 型白细胞/2 型淋巴细胞样蛋白 (Bcl-2) 和天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 (Caspase-3) 蛋白表达的影响。方法: 将 48 只 SD 大鼠随机分为 6 组, 即对照组、模型组、阳性药物组、生黄合剂低、中、高剂量组 (17.5, 35, 70 mg·kg⁻¹ 分别加入 5 mL·kg⁻¹ 生脉饮), 每组 8 只, 分别给药 7 d 后, 建立心肌缺血再灌注损伤 (MIRI) 模型。采用原位末端标记法 (TUNEL) 检测心肌细胞凋亡情况, 蛋白印迹法检测心肌细胞凋亡相关基因 Bax, Bcl-2, Caspase-3 蛋白的表达。结果: 与模型组比较, 生黄合剂能减少心肌细胞凋亡指数 (AI) 及 Bax, Caspase-3 蛋白的表达, 增加 Bcl-2 蛋白的表达, 提高 Bcl-2/Bax 的比值 ($P < 0.05$), 其中以生黄合剂高剂量组作用较为明显。结论: 生黄合剂对大鼠心肌缺血再灌注损伤具有保护作用, 其抗心肌细胞凋亡的机制可能与通过上调 Bcl-2, 下调 Bax 和 Caspase-3 基因表达, 提高 Bcl-2/Bax 的比值有关。

[关键词] 生黄合剂; 心肌缺血再灌注损伤; 细胞凋亡; Bax 蛋白; Bcl-2 蛋白; Caspase-3 蛋白

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)13-0244-04

Influence of Sheng-huang Mixtrue on Apoptosis Related Proteins Bax, Bcl-2 and Caspase-3 in Myocardial Ischemia-reperfusion Rats

GAO Yu-feng¹, WANG Xiao-jie¹, YAN Wen-cui², ZHANG Wei-na², LI Xin¹, ZHANG Feng-ying¹

(1. Chengde Medical College, Chengde 067000, China;

2. Chengde Nurse Training College, Chengde 067000, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the influence of Sheng-huang mixtrue on the apoptosis related proteins expression of Bcl-associated x protein (Bax), B-cell leukemia/lymphoma 2-like proteins (Bcl-2) and

[收稿日期] 20120119(006)

[基金项目] 河北省科学技术研究与发展计划项目(10276141)

[第一作者] 高玉峰, 硕士, 副教授, 从事预防医学教学科研工作, Tel: 0314-2291153, 13081898866, E-mail: cdmcyf@126.com

- [2] 谭仁祥. 植物成分分析[M]. 北京: 科学出版社, 2002; 486.
- [3] 陈英珠, 白卫娜, 吴萌, 等. 柿叶黄酮对载脂蛋白 E 缺失小鼠动脉粥样硬化的影响[J]. 中国老年学杂志, 2011(12): 2233.
- [4] Kullo I J, Bailey K R, Mc Connell J P, et al. Low-density lipoprotein particle size and coronary atherosclerosis in subjects belonging to hypertensive sibships [J]. Am J Hypertens, 2004, 17(9): 845.
- [5] 陈丽, 梁宇红, 裴世成, 等. 柿叶总黄酮对高脂血症大鼠血脂和血液流变学的影响[J]. 中成药, 2011, 33(8): 1397.
- [6] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002; 1202.
- [7] 杨宇杰, 王春民, 党晓伟. 山楂叶总黄酮对高脂血症大鼠血管功能损伤的保护作用[J]. 中草药, 2007, 18(11): 1687.
- [8] 陈煜, 李剑, 施海明. 血小板与动脉粥样硬化[J]. 国际心血管病杂志, 2011, 38(3): 141.
- [9] 王伟, 杨滨, 王岚, 等. 丹参山楂药对大鼠动脉粥样硬化的影响[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(6): 784.
- [10] 何作云, 耿建萌, 覃军. 辛伐他汀对食饵性兔动脉粥样硬化形成中血栓素、前列环素的作用及意义[J]. 中国微循环, 2003, 7(5): 284.

[责任编辑 何伟]

Aspartate-specific cysteinyl proteinase (Caspase-3) in myocardial ischemia-reperfusion injury rats. **Method:** SD rats ($n=48$) were divided randomly into six groups: normal control group, model group, positive control group, low-dose, medium-dose and high-dose Sheng-huang mixture groups ($n=8$). After the drug was administered to the six groups seven days, the Myocardial Ischemia-reperfusion injury in rats was established. TUNEL was used to detect the myocardial apoptosis index, The protein expressions of Bax, Bcl-2 and Caspase-3 were assayed by western blotting. **Result:** In comparison of the five other groups with model group, Sheng-huang mixture can decrease the myocardial apoptosis index and the protein expressions of Bax and Caspase-3, but increase the protein expressions of Bcl-2 in rats and the ratio of Bcl-2/Bax. Among which high dose Sheng-huang mixture group decreased much more than other groups. **Conclusion:** Sheng-huang mixture has the protective effects on myocardial ischemia-reperfusion injury in rats, which can inhibit the myocardial apoptosis of myocardial ischemia-reperfusion injury by increasing the protein expressions of Bcl-2 and reducing the protein expressions of Bax and Caspase-3.

[**Key words**] Sheng-huang mixture; myocardial ischemia-reperfusion injury; myocardial apoptosis; Bax protein; Bcl-2 protein; Caspase-3 protein

近年来,心肌缺血再灌注损伤(myocardial ischemia-reperfusion injury, MIRI)已成为冠状动脉搭桥术、冠状动脉溶栓术及介入治疗中常见的严重并发症,研究开发有效防治再灌注损伤的药物已成为医学研究的热点之一。生黄合剂由黄芩茎叶总黄酮和生脉饮组成。前期实验研究证明^[1-4],生黄合剂具有免疫调节、抗氧化、抗炎、抗病毒等作用,黄芩茎叶总黄酮与生脉饮具有交互作用,二者合用的效果优于单独使用。本实验通过建立大鼠 MIRI 模型,观察生黄合剂对心肌保护作用的机制。

1 材料与方法

1.1 药品及试剂 黄芩茎叶总黄酮,由承德医学院中药研究所提供,采用黄芩茎叶大孔吸附树脂提取法,纯度为 61.8%,批号 010608。生脉饮,北京同仁堂科技发展股份有限公司制药厂,批号 1261143。复方丹参滴丸,天津天士力制药股份有限公司,批号 110602。Bax, Bcl-2, Caspase-3 兔抗鼠多克隆抗体,美国 Santa 公司。

1.2 分组、给药及模型制备

1.2.1 分组及给药 健康 SD 大鼠 48 只,雌雄各半,体重 250~300 g,由北京大学医学部实验动物科学部提供,许可证号 SCXK(京)2006-0008。将 48 只大鼠随机等分为 6 组,即对照组、模型组、阳性药物组、生黄合剂低、中、高剂量组,每组 8 只。空白对照组、模型组灌等体积生理盐水,阳性药物组给予复方丹参滴丸($135 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、低、中、高剂量组分别给予不同剂量的生黄合剂(黄芩茎叶总黄酮 17.5, 35, 70 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 分别加入 5 $\text{mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 生脉饮溶解),均按 5 $\text{mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 体重灌胃,1 次/d,给药 7 d。给药结束后,除空白对照组(冠脉前降支仅穿线不结扎)外其

他组均建立 MIRI 模型。

1.2.2 MIRI 模型制备 大鼠用 4% 水合氯醛腹腔注射麻醉($10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$),取仰卧位固定,用针形电极插入大鼠四肢皮下记录标准肢体 II 导联心电图。颈部正中切口,气管插管,接人工呼吸机。于胸骨左缘 3~4 肋间切开胸壁,暴露心脏,在左心耳与肺动脉之间结扎左冠状动脉前降支,同时在结扎线与血管之间穿一直径 2 mm、长 5 mm 的硅胶管,结扎 30 min;然后剪断结扎线,取出硅胶管,再灌注 2 h,空白对照组仅穿线不结扎,同步监测肢体 II 导联心电图。实验中以左心室前壁紫绀和同步心电图 II 导联 ST 段抬高为结扎成功标志,以左心室前壁由紫绀渐变红润及 ST 段降低 1/2 为再灌注标志^[5]。

1.3 检测指标

1.3.1 心肌细胞凋亡的检测 按 TUNEL 试剂盒说明书检测心肌细胞凋亡。光学显微镜下观察,正常心肌细胞核呈蓝色,凋亡细胞核呈深浅不一的棕黄色。每例切片随机选取 5 个 400 倍视野,分别计数每个视野的凋亡细胞和细胞总数,以细胞凋亡指数(apoptosis index, AI)作为凋亡程度的指标,取 5 个视野凋亡指数的均值。

$$\text{AI} = \text{凋亡细胞数} / \text{细胞总数} \times 100\%$$

1.3.2 Bax, Bcl-2, Caspase-3 蛋白表达的检测 取各组大鼠左心室前壁心肌组织 300 mg 加入冰预冷的适量细胞裂解液,制成心肌细胞匀浆。冰上裂解 40 min, $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ $12\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$,离心 20 min 收集上清液,采用二喹啉甲酸(BCA)法进行蛋白定量测定。分别取 100 μg 样品蛋白在 12% 聚丙烯酰胺凝胶上电泳,电转移至 PVDF 膜上;一抗稀释浓度 1:200, ECL 检测试剂盒显影、洗片。以 β -actin 作为内参

照。胶片经扫描后获得图像,用 Bandleader 5.0 软件进行灰度分析,计算目标条带蛋白表达的灰度值与 β -actin 灰度值的比值。

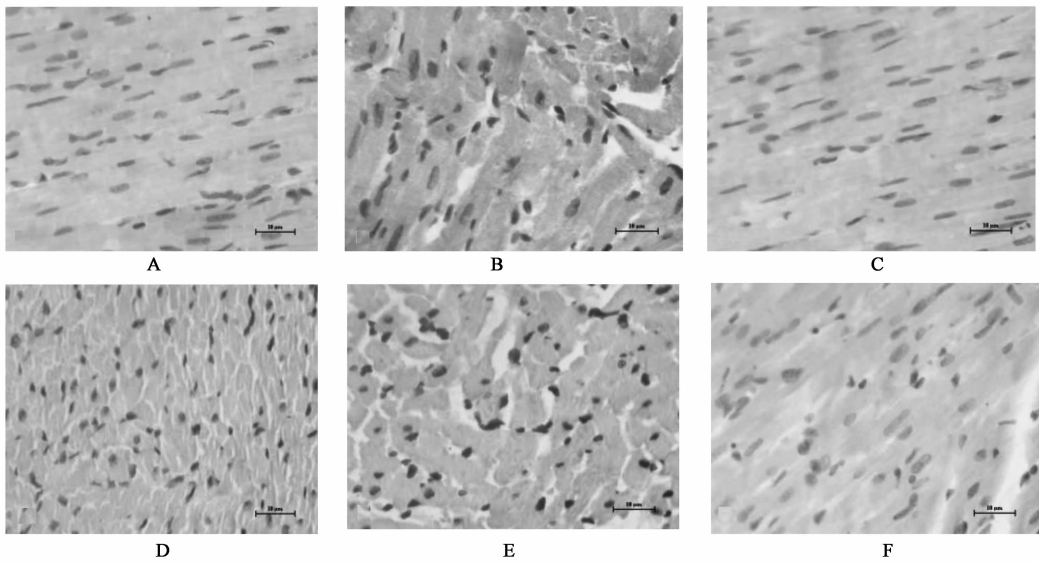
1.4 统计方法 采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 SNK 法, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 心肌细胞凋亡情况的检测 与对照组比较,模型组大鼠心肌细胞 AI 明显升高 ($P < 0.05$);与模型组比较,各用药组心肌细胞 AI 降低 ($P < 0.05$);生黄合剂高剂量组 AI 低于生黄合剂低、中剂量组 ($P < 0.05$),但高剂量组与阳性药物组比较差异无

统计学意义。见表 1、图 1。

2.2 Bax, Bcl-2, Caspase-3 基因蛋白表达 与对照组比较,模型组大鼠 Bax, Bcl-2, Caspase-3 蛋白表达升高 ($P < 0.05$), Bcl-2/Bax 比值降低 ($P < 0.05$);与模型组比较,各用药组 Bax, Caspase-3 蛋白表达降低 ($P < 0.05$),而 Bcl-2 蛋白表达升高 ($P < 0.05$), Bcl-2/Bax 比值升高 ($P < 0.05$);生黄合剂高剂量组 Bax, Caspase-3 蛋白表达低于生黄合剂低、中剂量组 ($P < 0.05$),而 Bcl-2 蛋白表达高于生黄合剂低、中剂量组 ($P < 0.05$),生黄合剂高剂量组与阳性药物组 Bax, Bcl-2, Caspase-3 基因蛋白表达及 Bcl-2/Bax 比值的比较差异均无统计学意义。见表 1,图 1。



A. 对照组; B. 模型组; C. 复方丹参滴丸; D. 生黄合剂低剂量组; E. 生黄合剂中剂量组; F. 生黄合剂高剂量组

图 1 生黄合剂对大鼠心肌细胞凋亡的影响 (TUNEL 染色, $\times 40$)

表 1 生黄合剂对大鼠心肌 Bcl-2, Bax 及 Caspase-3 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

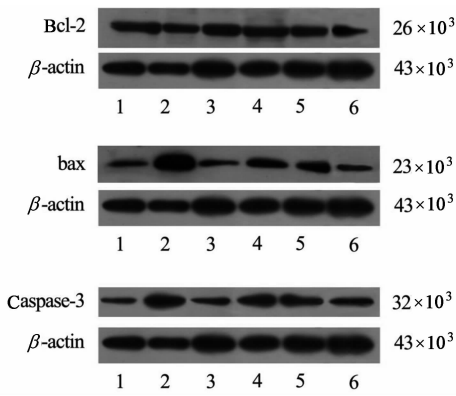
组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	AI/%	Bcl-2	Bax	Bcl-2/Bax	Caspase-3
对照	-	4.30 ± 1.87	1.88 ± 0.07	1.38 ± 0.11	1.33 ± 0.08	0.486 ± 0.017
模型	-	34.82 ± 1.45 ¹⁾	2.24 ± 0.09 ¹⁾	3.26 ± 0.06 ¹⁾	0.57 ± 0.06 ¹⁾	0.871 ± 0.019 ¹⁾
生黄合剂	17.5	31.51 ± 2.13 ^{1,2,3)}	2.37 ± 0.13 ^{1,2,3)}	1.52 ± 0.13 ^{1,2,3)}	1.64 ± 0.09 ^{1,2,3)}	0.703 ± 0.021 ^{1,2,3)}
	35	26.71 ± 2.01 ^{1,2,3)}	2.40 ± 0.11 ^{1,2,3)}	1.49 ± 0.07 ^{1,2,3)}	1.67 ± 0.13 ^{1,2,3)}	0.623 ± 0.012 ^{1,2,3)}
	70	20.81 ± 1.96 ^{1,2)}	2.65 ± 0.15 ^{1,2)}	1.21 ± 0.08 ^{1,2)}	2.06 ± 0.15 ^{1,2)}	0.542 ± 0.021 ^{1,2)}
复方丹参滴丸	135	21.23 ± 1.65 ^{1,2)}	2.59 ± 0.06 ^{1,2)}	1.24 ± 0.05 ^{1,2)}	1.95 ± 0.11 ^{1,2)}	0.577 ± 0.023 ^{1,2)}

注:与对照组比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$;与高剂量组比较³⁾ $P < 0.05$ 。

3 讨论

MIRI 是心肌缺血后在一定时间内恢复血供,缺血心肌发生的更严重的损伤。研究发现^[5],细胞凋亡与心肌缺血再灌注损伤密切相关,细胞凋亡的多少决定了心功能损害的程度。近年来研究发现,药

物预处理可抑制心肌细胞凋亡^[7-8],降低心肌梗死面积^[9],对缺血再灌注心肌细胞具有保护作用。本课题通过 TUNEL 法检测心肌细胞凋亡发现,模型组心肌细胞凋亡指数显著升高,经生黄合剂干预后,心肌细胞凋亡指数下降,表明生黄合剂有抑制心肌细



1. 对照组; 2. 模型组; 3. 复方丹参组;

4. 生黄合剂低剂量组; 5. 生黄合剂中剂量组; 6. 生黄合剂高剂量组

图2 生黄合剂对大鼠心肌 Bax, Bcl-2, Caspase-3 蛋白表达的影响

胞凋亡的作用,与上述学者研究结果一致。

细胞凋亡是由基因控制的有序化的主动死亡过程 Bcl-2 是一种抑制细胞凋亡的基因, Bax 则促进细胞凋亡, 细胞内 Bcl-2 和 Bax 的比例决定细胞是生存还是凋亡。近年来研究发现^[10-11], 药物预处理对缺血再灌注心肌细胞具有保护作用, 可抑制 MIRI 后心肌细胞凋亡, 其作用机制与上调 Bcl-2 蛋白表达, 下调 Bax 蛋白表达, 提高 Bcl-2/Bax 比值有关。Caspase 家族是细胞凋亡发挥关键作用的一组半胱氨酸蛋白酶, Caspase-3 在凋亡级联反应中处于核心地位^[12]。Caspase-3 引起 DNA 损伤修复酶降解, 同时激活核酸内切酶, 从而使细胞凋亡^[13]。王萍^[14]研究发现, 桑叶总黄酮能下调 Caspase-3 蛋白表达, 减少细胞凋亡, 对大鼠心肌缺血再灌注损伤具有保护作用。本实验采用蛋白印迹法检测心肌细胞凋亡相关基因 Bax, Bcl-2, Caspase-3 蛋白的表达发现, 模型组 Bax、Bcl-2 及 Caspase-3 蛋白表达均明显增多, 但在 Bax、Bcl-2 中, 以 Bax 的增多更为明显, 使 Bcl-2/Bax 比值降低, 促进细胞凋亡; 生黄合剂预处理后 Bcl-2 蛋白表达增加, Bax 及 Caspase-3 蛋白表达减少, 使 Bcl-2/Bax 比值升高, 抑制心肌细胞凋亡, 以生黄合剂高剂量组作用较为明显。

综上所述, 生黄合剂能减轻心肌缺血再灌注损伤, 抑制心肌细胞凋亡, 具有心肌保护作用, 尤其是生黄合剂高剂量组作用明显, 其机制可能通过上调 Bcl-2, 下调 Bax2 及 Caspase-3 基因表达, 升高 Bcl-2/Bax 比值有关。

【致谢】承德医学院 2009 级护理本科王欢、孟璇璇、张琳琳、李莉、赵晶 5 名学生协助实验。

【参考文献】

- [1] 张凤英, 高玉峰, 宋鸿儒. 黄芩茎叶提取物与生脉饮抗柯萨奇病毒 B3 的体外研究[J]. 天津医药, 2005, 33(11): 716.
- [2] 周晓春, 颜勇, 王宝忠, 等. 生黄合剂对病毒性心肌炎小鼠血清 SOD 活性和 MDA 含量的影响[J]. 承德医学院学报, 2008, 25(1): 10.
- [3] 高玉峰, 张凤英, 米术斌. 生黄合剂对病毒性心肌炎小鼠的干预实验[J]. 中国临床康复, 2006, 36(10): 51.
- [4] 郭亚春, 周晓春, 宋鸿儒, 等. 黄芩茎叶总黄酮与生脉饮对病毒性心肌炎心脏细胞因子 mRNA 表达的影响[J]. 山东医药, 2008, 48(2): 46.
- [5] Lindsten T, Ross A J, King A, et al. The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members Bax are essential for normal development of multiple tissues[J]. Mol Cell, 2006, 6(6): 1389.
- [6] 刘永平, 龚明玉, 周晓慧. 黄芩茎叶总黄酮抑制大鼠心肌缺血再灌注时细胞凋亡的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(12): 146.
- [7] 龚明玉, 张力, 杜超, 等. 灯盏素对缺血再灌注损伤大鼠心肌超微结构及细胞凋亡的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(5): 147.
- [8] 龚明玉, 周晓慧, 张力, 等. 灯盏素抑制大鼠心肌缺血再灌注损伤诱导的细胞凋亡. 中国中医基础医学杂志, 2011, 17(5): 517.
- [9] 路萌萌, 于玲, 张桐菲, 等. 曲古菌素 A 对心肌缺血再灌注损伤大鼠的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(5): 197.
- [10] 卜丽梅, 关凤英, 乔萍, 等. 没食子酸对大鼠缺血再灌注损伤后细胞凋亡的保护作用及作用机制[J]. 中国实验诊断学, 2010, 14(11): 1693.
- [11] 张远恒, 马业新. 烟酸对缺血/再灌注损伤大鼠心肌细胞凋亡及 Bax、Bcl-2 和 Fas 表达的影响[J]. 现代中西医结合杂志, 2010, 19(14): 1713.
- [12] Kim K S, Yoon S T, Li J, et al. Disc degeneration in the rabbit: a biochemical and radiological comparison between four disc injury models[J]. Spine, 2005, 30(1): 30.
- [13] 王爱珍, 张振宁, 张元明. 地塞米松对脑缺氧缺血新生大鼠细胞凋亡抑制蛋白 mRNA 及 Caspase-3 活性的影响[J]. 实用儿科临床杂志, 2007, 22(12): 923.
- [14] 王萍. 桑叶总黄酮对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(19): 185.

【责任编辑 何伟】